

Ferramenta em R para comparar padrões de expressão de vias metabólicas e proteínas associadas ao glioblastoma**R tool to compare expression patterns of metabolic pathways and glioblastoma-associated**

DOI:10.34117/bjdv6n1-244

Recebimento dos originais: 30/11/2019

Aceitação para publicação: 23/01/2020

Heleno Carmo Borges Cabral

Doutorando em Nanociências pela Universidade Franciscana

Instituição: Universidade Franciscana - UFN

Endereço: Av. Rafael Gonçalves, 1844 - Bairro Lagoa, Rosário do Sul - RS, Brasil

E-mail: heleno@cabral.inf.br**Bruna Garcia Pedrolo**

Doutoranda em Nanociências pela Universidade Franciscana

Instituição: Universidade Franciscana

Endereço: Rua Olavo Bilac, 143/201 - Bairro Centro, Santa Maria - RS, Brasil

E-mail: brunapedrolo@gmail.com**Josiane Fontoura dos Anjos**

Doutoranda em Nanociências pela Universidade Franciscana

Instituição: Universidade Franciscana - UFN

Endereço: Rua dos Andradas, 1614 - Bairro Centro, Santa Maria - RS, Brasil

E-mail: josiane.fontoura@iffarroupilha.edu.br**Michele Rorato Sagrillo**

Doutora em Farmacologia pela Universidade Federal de Santa Maria

Instituição: Universidade Franciscana - UFN

Endereço: Rua dos Andradas, 1614 - Bairro Centro, Santa Maria - RS, Brasil

E-mail: sagrillorm18@gmail.com**Evamberto Garcia de Góes**

Doutor em Engenharia Nuclear pela Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande - FURG

Endereço: Av. Itália, KM 8 - Bairro Carreiros, Rio Grande - RS, Brasil

E-mail: evambertogoes@gmail.com**José Luiz Rybarczyk Filho**

Doutor em Física pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Instituição: Universidade Estadual Paulista - UNESP

Endereço: Distrito de Rubião Júnior, s/n - Bairro Rubião Júnior, Botucatu - SP, Brasil

E-mail: jose.luiz@unesp.br**Éder Maiquel Simão**

Doutor em Física pela Universidade Federal de Santa Maria

Instituição: Universidade Franciscana - UFN

Endereço: Rua dos Andradas, 1614 - Bairro Centro, Santa Maria - RS, Brasil

E-mail: edersimao@gmail.com

RESUMO

Um dos desafios da era pós-genômica é a compreensão da estrutura e do comportamento de redes complexas de interações moleculares que controlam o comportamento das células. Isto impõe, a procura por métodos inovadores para tratar estes dados com a finalidade de melhorar a compreensão dos processos biológicos que atuam no interior da célula. Neste contexto é possível interligar as vias e melhorar a compreensão das interações biológicas na ausência ou na presença de uma determinada doença, utilizando-se de ferramentas como a linguagem R e seus pacotes e scripts disponíveis. Com a nanotecnologia, surgem obstáculos na terapia, como a barreira sangue-cérebro, que impede a livre difusão da maioria das moléculas estranhas, incluindo agentes terapêuticos e com isso o estudo de redes de interação propõe-se contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos nanoencapsulados, disponibilizando subsídio para o entendimento de como as vias se comportam quando induzidas a diferentes tipos de tratamentos e métodos. Os resultados preliminares, consistiram na construção da rede basal com 104 vias selecionadas a partir de critérios pré-estabelecidos, sendo que as análises de expressão do glioblastoma tratado observou-se que a via Receptor de quimiocinas está diretamente ligada a presença do fármaco no glioblastoma.

Palavras-chave: rede de vias, análise de vias, vias metabólicas, câncer

ABSTRACT

One of the challenges of the post-genomic era is understanding the structure and behavior of complex networks of molecular interactions that control the behavior of cells. This implies the search for innovative methods to treat these data in order to improve the understanding of the biological processes that work inside the cell. In this context it is possible to interconnect the pathways and improve the understanding of biological interactions in the absence or presence of a particular disease, using tools such as the R language and its available packages and scripts. With nanotechnology, obstacles arise in therapy, such as the blood-brain barrier, which prevents the free diffusion of most foreign molecules, including therapeutic agents and thus the study of interaction networks is proposed to contribute to the development of new nanoencapsulated drugs, providing support for the understanding of how the pathways behave when induced to different types of treatments and methods. Preliminary results consisted in the construction of the basal network with 104 routes selected from pre-established criteria, and the expression analyzes of the treated glioblastoma was observed that the chemokine receptor pathway is directly linked to the presence of the drug in glioblastoma.

Key words: network of pathways, analysis of pathways, metabolic pathways, cancer

1 INTRODUÇÃO

Um dos desafios mais importantes para a biologia da era pós-genômica é a compreensão da estrutura e do comportamento de redes complexas de interações moleculares que controlam o comportamento das células (BARABÁSI, 2004). O tamanho e a complexidade dos dados biológicos coletados durante os últimos anos incluem informações que requerem uma abordagem integradora, procurando novos métodos a fim de melhorar a compreensão dos processos biológicos que atuam no interior da célula. Na presença de doenças há variações dos fenótipos celulares o que muda todo o processo de análise. Esse processo varia também na presença de fármacos distintos.

Dentre esses tratamentos destacam-se os quimioterápicos. Além das alterações celulares, observa-se que esses medicamentos provocam consequências clínicas, tais como, náuseas, vômitos,

lesões no esôfago, má nutrição, fraturas, desequilíbrio hidroeletrolítico e acidobásico (SAWADA, 2009). A forma de atuação destes fármacos no organismo e suas consequências podem ser analisadas pelo método de análise da expressão gênica, dentre eles: método de reação em cadeia da polimerase em tempo real (*PCR Real Time*), microarranjos e RNASeq, sendo que o último não necessita de uma lista pré-definida dos genes que se deseja detectar (WANG et al., 2009).

Analisando a ocorrência dos genes comuns e da quantidade desses genes nessas vias, têm-se a interação via-via, podendo ser evidenciada em uma rede de interações como proposto por Vieira (2016), onde através da linguagem PHP foi desenvolvida uma ferramenta para geração da rede. Propõe-se então, desenvolver com o uso da linguagem R, uma ferramenta interligando os pacotes do *Bioconductor* e *scripts* já disponíveis, uma ferramenta *desktop* que irá aprimorar desde o processamento inicial, até o resultado final, com um ganho de mais de 80%, melhorando a compreensão das interações biológicas na ausência ou na presença de uma determinada doença (KESSLER et al., 2013).

Com o avanço nos tratamentos utilizando fármacos nanoencapsulados há também um eminente crescimento das pesquisas envolvendo a ativação de proteínas responsáveis pela regulação de doenças genéticas. Para tais experimentos, serão utilizados dados de Glioblastoma Multiforme (GBM), que é o tipo mais comum e agressivo de tumor cerebral primário maligno em adultos (BAÚ, 2016). Os GBM, são recidivos, embora 10% tenham uma história clínica prévia de astrocitoma de menor grau, sendo esses denominados de GBM secundário (VAN MEIER et al., 2010).

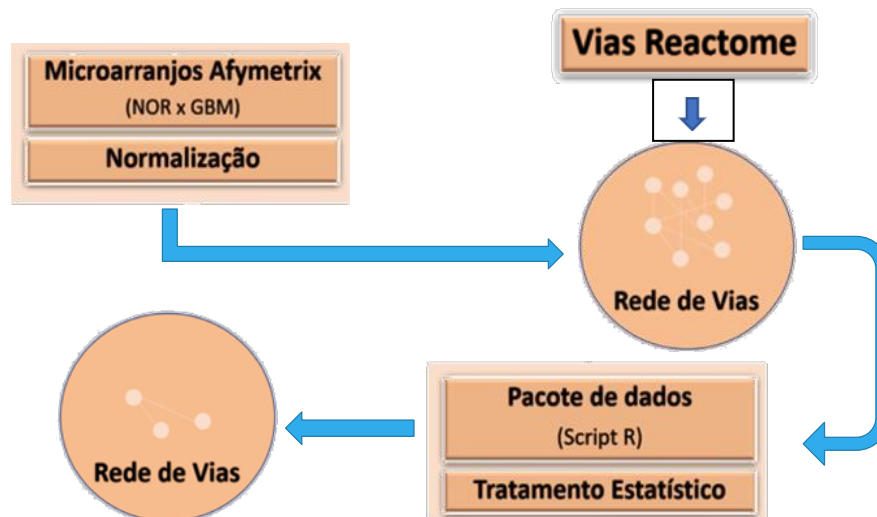
Como tratamento para combater o glioblastoma juntamente com a radioterapia e quimioterapia, utilizam-se de fármacos como a Temozolomida (TMZ), Bevacizumabe (BVZ) e a Dibenzazepina (DBZ). Nos últimos anos, enormes esforços para o entendimento molecular desses tumores vem sendo feitos, e GBM foi selecionado como um dos três primeiros cânceres a serem sequenciados pelo projeto do “Atlas do Genoma do Câncer” (*The Cancer Genome Atlas*, TCGA) do Instituto Nacional de Saúde (*National Institutes of Health's*, NIH) dos Estados Unidos, sendo hoje, um dos tumores com maior entendimento a nível molecular. Esses esforços resultaram na identificação de fatores moleculares de prognóstico e de vulnerabilidade que podem ser alvo no desenvolvimento de novos tratamentos e no entendimento dos fatores envolvidos com a gliomagenese (WEATHERS; GILBERT, 2016).

2 METODOLOGIA

Nos métodos, foram utilizadas amostras de microarranjos extraídas do banco de dados *Gene Expression Omnibus* (GEO) de GBM *versus* Normal (GEO, 2018). Os dados foram normalizados pela média robusta para múltiplos *chips* (RMA) (SIMÃO et al., 2012). Para analisar a expressão das

vias do Banco de Dados *Reactome* (REACTOME, 2018), sobre o GBM foi desenvolvida uma ferramenta em R (*Script* de dados) baseada no trabalho publicado por Molan (2018), sendo que a mesma está sendo aprimorada, com o princípio de elaborar a rede de interação de vias significativamente alteradas de forma automatizada (Figura 1).

Figura 1 – Estrutura da metodologia. Foram utilizadas amostras normalizadas de GBM e controle extraídas do banco de dados GEO, além de amostras de vias extraídas do banco de dados *Reactome*.



Fonte: Construção do Autor

As vias foram todas selecionadas do banco de dados *Reactome*, com os seguintes critérios de seleção:

- vias que continham entre 10 e 100 genes, para determinar funções específicas de cada grupo funcional;
- vias que desempenham funções em cada grande grupo funcional do *Reactome*: *Immune system*, *Metabolismo of RNA*, *Chromatin organization*, *DNA replication*, *DNA repair*, *Digestion and absorption*, *Circadian clock*, *Developmental biology*, *Signal transduction*, *Metabolism*, *Transport of small molecules*, *Cell cycle*, *Programmed Cell Death*, *Cellular responses to external stimull*, *Extracelular matrix organization*, *Protein localization*, *Cell-cell communication*, *Vesicle-mediated transport*, *Metabolism of proteins*, *Disease*, *Gene Expression*, *Hemostasis*, *Neuron system* e *Reproduction*;
- Para evitar redundâncias na construção da rede também foram excluídas vias com mais 90% dos genes em comum.

Para o desenvolvimento das análises, foram usadas amostras de microarranjos *Affymetrix* extraídas do banco de dados *GEO* (GEO, 2018), através da mineração dos dados foram definidas

amostras de glioblastoma com o maior número de incidências, como percebe-se a seguir; com as informações sobre seus estudos publicados no GEO:

- Série amostral com registro GSE39223, incluindo 3 amostras controle, 3 amostras de tecido cerebral com glioblastoma tratado com Bevacizumabe e 3 amostras de tecido cerebral com glioblastoma tratado com Dibenzazepina;
- Série amostral com registro GSE37956 com 3 amostras controle e 3 amostras de tecido cerebral de glioblastoma tratado com Bevacizumabe.

As amostras selecionadas foram produzidas pela análise de microarranjos, da *Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array*. Dentre as amostras mencionadas anteriormente, destacam-se os seguintes fármacos utilizados para combater o câncer: o Bevacizumabe (KIRCHHOF, 2015), a Dibenzazepina (YEUNG, 2011) e a Temozolomida, esse último, utilizado juntamente com a radioterapia (BOCCARD, 2015).

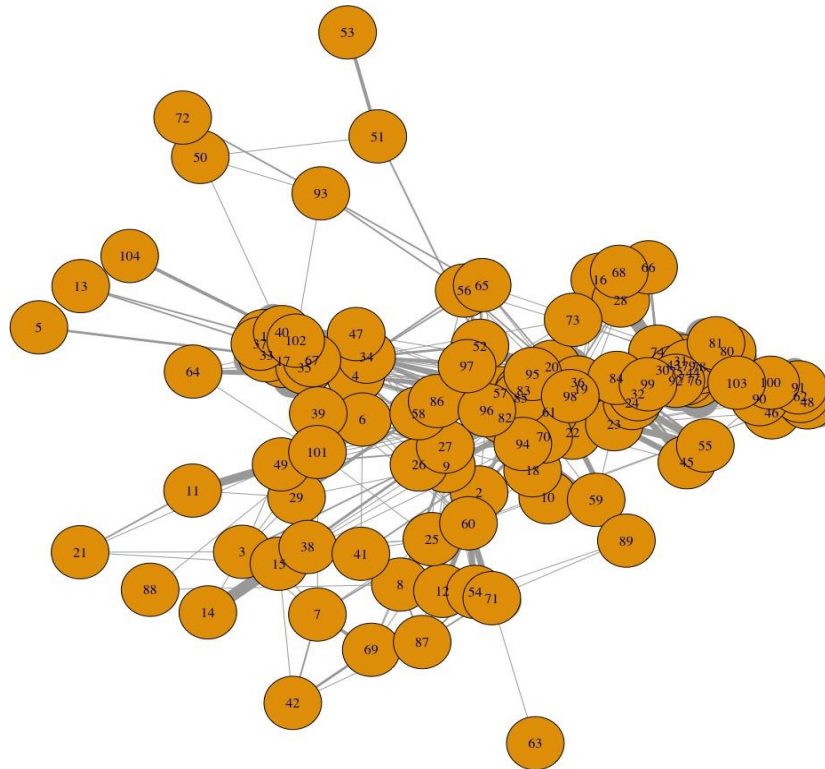
As séries foram normalizadas usando a média robusta para múltiplos *chips* (RMA) (SIMÃO et al., 2012), usando a ferramenta R; logo após os dados foram calculados usando o pacote ADAM (do inglês: *Activity and Diversity Analysis Module*) (MOLAN, 2018), que geram resultados multiestatísticos.

Primeiramente foi construída uma rede basal, usando apenas as 104 vias do Reactome, de um total de mais de 2.400 disponíveis. A rede foi construída em ambiente R, usando o pacote de dados *igraph*, com duas análises preliminares sendo realizadas usando os dados das séries do GEO: GSE39223 e GSE37956.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A rede basal consiste em identificar os nós que correspondem as 104 vias e as interações que estão representadas pelos genes comuns (quanto mais intensa a interação maior a quantidade de genes em comum) entre cada via. A figura 2 mostra a rede basal, sem atuação de nenhuma doença. Observa-se nesta rede que há dois grupos bem conectados e, algumas vias com pouca interação (poucos genes em comum). Esse resultado mostra que algumas vias possuem poucos genes em comum com outras vias (ex: vias *Intra-Golgi traffic* (50) e *Intraflagellar transport* (51), responsáveis pelo metabolismo de proteínas e transporte mediado por vesículas, respectivamente), o que define uma função bem específica para cada via.

Figura 2 – Representação da rede basal, sem interação de doenças, no seu estado puro, onde percebe-se que os nós mais conectados estão mais próximos e os vértices de ligação mais espessos.



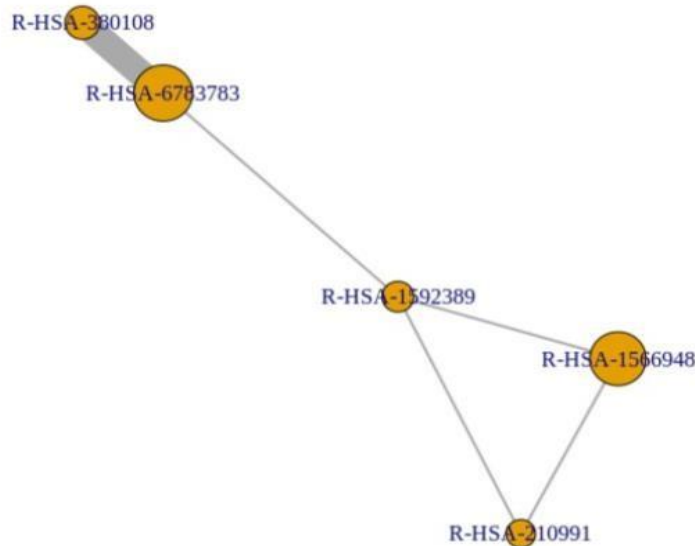
Fonte: Construção do Autor

Com as amostras de GBM tratado com Bevacizumabe *versus* o controle, foi calculada através da ferramenta R os testes estatísticos propostos por Molan (2018). Na rede de vias da figura 3, estão apresentados os resultados da análise, onde as interações são os genes em comum entre duas vias e o tamanho do nó representa a quantidade de genes nessa via.

Observou-se que as vias: *Chemokine receptors bind chemokines* (R-HSA-380108), *Interleukin-10 signaling* (R-HSA-6783783), *Activation of Matrix Metalloproteinases* (R-HSA-1592389), *Elastic fibre formation* (R-HSA-1566948) e *Basigin interactions* (R-HSA-210991) tiveram alto grau de significância em seus valores de P (Figura 3).

A via *Chemokine receptors bind chemokines*, ou Receptor de quimiocinas é uma via específica que interage com um tipo de citocina chamada quimiocina. Elas desencadeiam um fluxo de cálcio intracelular que leva a um estímulo químico em GBM na presença de quimioterápicos (SHARMA, et al., 2017). Outra via em destaque é a *Activation of Matrix Metalloproteinases*, ou Ativação da matriz metaloprotease, que está envolvida no crescimento da angiogênese em câncer. A ativação desta via e outras vias de ativação da VEGF resulta em uma supressão do crescimento do tumor in vivo, levando ao desenvolvimento de Bevacizumabe (FERRARA, et al., 2004).

Figura 3 – Representação da rede da amostra de Glioblastoma tratado com Bevacizumabe, gerado através do pacote igrph da ferramenta R. Onde R-HSA-380108 corresponde a Chemokine receptors bind chemokines, (R-HSA-6783783): Interleukin-10 signaling, (R-HSA-1592389): Activation of Matrix Metalloproteinases, (R-HSA-1566948): Elastic fibre formation e (R-HSA-210991): Basigin interactions.



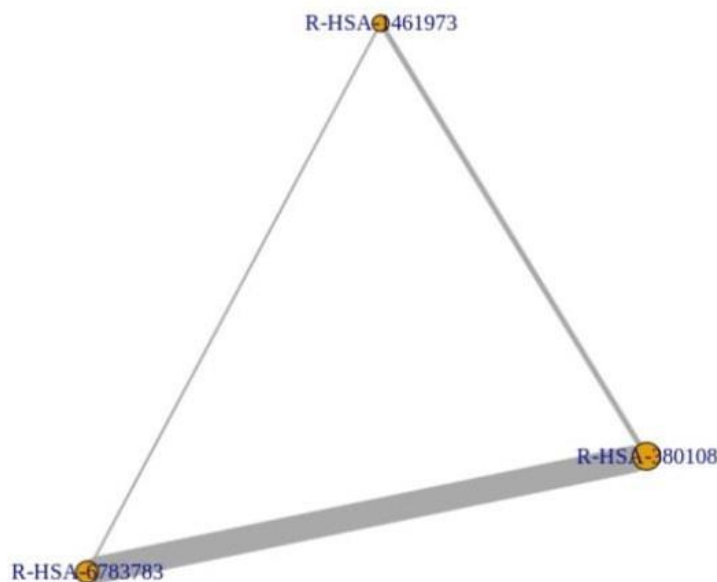
Fonte: Construção do Autor

Também destacam-se as vias *chemokine receptors bind chemokines* (R-HSA-380108) que possuem vários genes em comum expressos (um total de 9) na via *interleukin-10 signaling* (R-HSA-6783783), em razão da espessura do vértice de ligação, sendo eles: *CCL5*, *CCL20*, *CCR1*, *CCR2*, *CCR5*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL8* e *CXCL10*, onde destaca-se dentre eles os genes *CCL5*, *CCR1* e *CCR5*. O primeiro é um receptor de quimiocina humana e os demais seus ligantes associados, onde percebe-se a migração de macrófagos-NK; Interação célula T / DC (PALOMINO; MARTI, 2015), demonstrando assim, porque essas vias interagem entre si, sendo a segunda via responsável pela ativação do sistema imune (PALOMINO; MARTI, 2015; SIMPSON et al., 2003). O gene *CXCL8*, citado por Sharma e colaboradores (2017), mostrou que na análise da ontologia genética identificou o *CXCL8* como uma quimiocina regulada no GBM em comparação com astrocitomas difusos. Esse gene também afeta a sinalização autócrina e parácrina que promove a proliferação celular e neovascularização com mimetismo vascular.

Em relação as amostras de Glioblastoma tratado com Bevacizumabe e Dibenzazepina, foram analisadas 3 amostras controle, 3 amostras de tecido cerebral com glioblastoma tratado com o fármaco Bevacizumabe (BEV) e 3 amostras de tecido cerebral com glioblastoma tratado com o fármaco Dibenzazepina (DBZ), sendo que após a normalização e aplicação de testes multiestatísticos, conforme relatado anteriormente, percebeu-se que as vias *Defensins* (R-HSA-1461973), *Interleukin-10 signaling* (R-HSA-6783783) e *Chemokine receptors bind chemokines* (R-HSA-380108) na

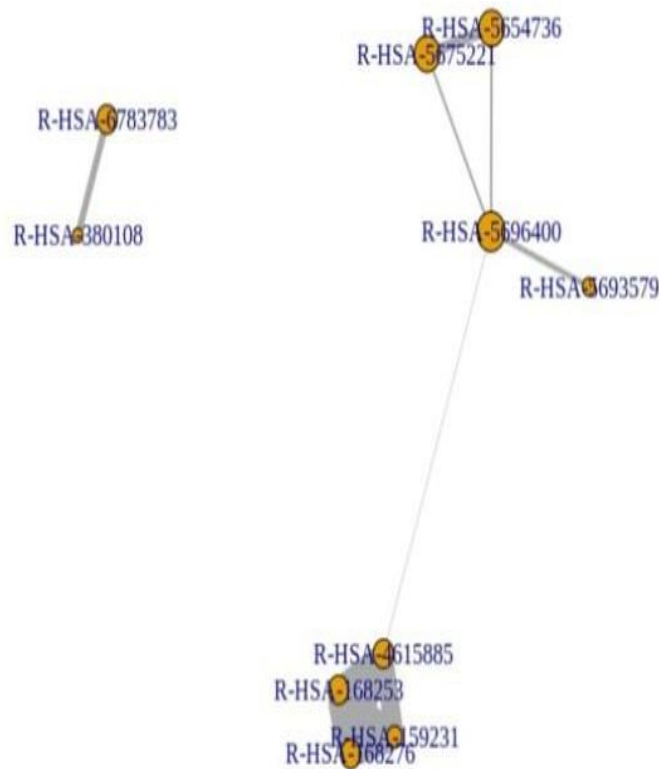
amostra GSE39223 em relação ao fármaco Bevacizumabe (Figura 4), já em relação ao fármaco Dibenzazepina, observa-se uma forte interação de genes diferencialmente expressos entre as vias *SUMOylation of DNA replication proteins* (R-HSA-4615885), *Host Interactions with Influenza Factors* (R-HSA-168253), *Transport of Mature mRNA Derived from an Intronless Transcript* (R-HSA-159231) e *NS1 Mediated Effects on Host Pathways* (R-HSA-168276), havendo um nó mais afastado entre as vias *Signaling by FGFR1* (R-HSA-5654736), *Negative regulation of MAPK pathway* (R-HSA-5675221), *Dual Incision in GG-NER* (R-HSA-5696400) e *Homologous DNA Pairing and Strand Exchange* (R-HSA-5693579) e mais duas vias afastadas do nó central que também possuem diferenciação de expressão: a *Interleukin-10 signaling* (R-HSA-6783783) e *Chemokine receptors bind chemokines* (R-HSA-380108), em relação ao fármaco Dibenzazepina (Figura 5). Algumas vias permanecem com a mesma expressão do resultado anterior para o fármaco Bevacizumabe a via Receptor de quimiocinas também aparece alterada na presença do fármaco Dibenzazepina associada ao tratamento do GBM.

Figura 4 – Representação da rede da amostra de Glioblastoma tratado com Bevacizumabe, gerado através do pacote *igraph* da ferramenta R. Onde R-HSA-1461973 corresponde a via Defensins, R-HSA-6783783: Interleukin-10 signaling e R-HSA-380108: *Chemokine receptors bind chemokines*.



Fonte: Construção do Autor

Figura 5– Representação da rede da amostra de Glioblastoma tratado com Dibenzazepina, gerado através do pacote *igraph* da ferramenta R com suas respectivas vias envolvidas.



Fonte: Construção do Autor

A via de ativação da *MAPK*, é usada com um prognóstico de resultado como alvo terapêutico no uso da Dibenzazepina (SCHULZ, et al., 2018). A expressão da via pode representar a ativação deste alvo em câncer de GBM.

4 CONCLUSÃO

Com base nos resultados analisados, pode-se verificar que a eficácia no processamento das vias e a construção das redes de interações tiveram um grande ganho de tempo em relação a trabalhos desenvolvidos anteriormente, o que vem a facilitar a sua utilização como subsídio às demais áreas correlatas a nanociências, como a biologia e farmácia, pois através dos testes iniciais e a proposta da ferramenta *desktop* para que o usuário possa apenas com seus dados de entrada, indicar com qual(is) via(s) que pretende trabalhar. Do ponto de vista biológico percebeu-se, em síntese, que as vias conectadas possuem interações que estão envolvidas com o tratamento do GBM (gene *CXCL8* como uma quimiocina regulada no GBM). Além de vias específicas que são expressas na presença dos fármacos Bevacizumabe e Dibenzazepina (via Receptor de quimiocinas). Uma análise biológica mais aprofundada deverá ser realizada para comprovar a eficácia, da ferramenta metodológica, com a finalidade de validar todo o sistema em desenvolvimento, aliando a linguagem *Shiny (layout*

diferenciado e interativo disponível para ambiente virtual) como diferencial, disponibilizado ao usuário.

REFERÊNCIAS

BARABÁSI, A. L.; OLTVAI, Z. **Network biology: Under standing the cell's functional organization**. s.l.: Nature Reviews Genetics, 2004. pp. 101-113, 2004.

BAÚ, C. E. G. **Identificação de genes diferencialmente expressos em glioblastoma e sua relação nas vias do sistema imunológico**. 2016. 49 f. Dissertação (Mestrado em Nanociências) – Centro Universitário Franciscano de Santa Maria, Santa Maria/RS, 2016.

BOCCARD, S. G.; MARAND, S. V; GERACI, S. **Inhibition of DNA-repair genes Erccl and Mgmt enhances temozolomide efficacy in gliomas treatment: A pre- clinical study**. Oncotarget, p. 1–13, 2015.

FERRARA, N.; HILLAN, K. J.; GERBER, H-P.; NOVOTNY, W. **Discovery and development of Bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer**. Nature Reviews – Drug Discovery. v. 3: 391-400, 2004.

GEO, **GENE EXPRESSION OMNIBUS**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>>. Acesso em 9 de novembro de 2018.

KESSLER, T.; HACHE, H.; WIERLING, C. **Integrative analysis of cancer-related signaling pathways**. Frontiers in Physiology. v. 4, Article 124. 2013.

KIRCHHOF, S.; GREGORITZA, M.; MESSMANN, V. **Diels–Alder hydrogels with enhanced stability: First step toward controlled release of Bevacizumab**. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 96, n. August, p. 217–225, 2015.

MOLAN, A. L; SECO, G. B. S.; TAKEDA, A. A. S.; RYBARCZYK FILHO, J. L. **ADAM – Activity and Diversity Analysis Module**. Disponível em: <<https://git.bioconductor.org/packages/ADAM>>. Acesso em 10 de outubro de 2018.

PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C. **Chemokines and immunity**. Einstein. v. 13, n. 3: 469-473, 2015.

REACTOME, **Reactome Pathway Database**. Disponível em: <<http://www.reactome.org>>. Acesso em 23 de setembro de 2018.

SAWADA, N. O.; NICOLUSSI, A. C.; OKINO, L. CARDOZO, F. M. C.; ZAGO, M. M. F. **Avaliação da qualidade de vida de pacientes com câncer submetidos à quimioterapia**. Revista Esc. Enferm. USP, v. 24, p 581-587, 2009.

SCHULZ, G. B.; GRIMM, T.; JOKISCH, F.; CASUSCELLI, J.; BUCHNER, A.; KRETSCHMER, A.; STIEF, C.; HORST, D.; KARL, A. **Therapeutic and diagnostic implications of the NOTCH and MAPK pathways in urothelial bladder cancer**. 33rd Annual EAU Congress Copenhagen - Eur Urol Suppl. v. 17, n. 2: 652, 2018.

SHARMA, I.; SINGH, A.; SHARMA, C. K.; SAXENA, S. **Gene Expression Profiling of Chemokines and Their Receptors in Low and High Grade Astrocytoma**. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. v. 18: 1307-1313, 2017.

SIMÃO, E. M.; BUGS, C. A.; CASTRO, M. A. A.; SINIGAGLIA, M.; LIBRELOTTO, G. R.; MOMBACH, J. C. M. **Induced genome maintenance pathways in pre-cancer tissues describe an anti-cancer barrier in tumor development**. Molecular BioSystems, v.8(11), p. 3003-9, 2012.

SIMPSON, K. J.; HENDERSON, N. C.; BONE-LARSON, C. L.; LUKACS, N. W.; HOGABOAM, C. M.; KUNKEL, S. L. **Chemokines in the pathogenesis of liver disease: so many players with poorly defined roles**. Clinical Science. n. 104: 47-63, 2003.

VAN MEIR, E. G.; HADJIPANAYIS, C. G.; NORDEN, A. D.; SHU, H. K.; WEN, P. Y.; OLSON, J. J. **Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to cure for malignant glioma**. CA Cancer J Clin. n. 60: 166-193, 2010.

VIEIRA, S.A. G. **Identificação de padrões de expressão em doenças genéticas usando uma rede de integração de vias de manutenção do genoma, angiogênese hipóxia e vigilância imunológica**.

2016. 98 f. Tese (Doutorado em Nanociências) – Centro Universitário Franciscano de Santa Maria, Santa Maria/RS, 2016.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. **RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics**. NYH PublicAccess, 2009.

WEATHERS, S. S.; GILBERT, M. R. **Toward Personalized Targeted Therapeutics: An Overview**. Neurotherapeutics, 2016.

YEUNG, T. M.; GANDHI, S. C.; BODMER, W. F. **Hypoxia and lineage specification of cell line-derived colorectal cancer stem cells**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 108, n. 11, p. 4382–4387, 2011.